

# 동물분변에서 *Escherichia coli* O157:H7의 분리 및 이들 균이 생산하는 Verotoxin-2의 생물화학적 특성

## I. 소와 돼지의 분변에서 *E coli* O157:H7의 분리 및 Verotoxin-2 생산에 관여하는 파아지의 분리에 관하여

차 인 호 · 김 용 환\*

부산시보건환경연구원  
경상대학교 수의과대학\*  
(1995년 12월 15일 접수)

## Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from animal feces and biochemical characteristics of Verotoxin-2 produced by these strains

### I. Study on the phages related to production of Verotoxin-2, and Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from feces of cattle and pigs

In-ho Cha, Yong-hwan Kim\*

Pusan Institute of Health and Environment,  
College of Veterinary Kyeongsang National University\*  
(Received Dec 15, 1995)

**Abstract :** Three and 2 strains of *E coli* O157 were isolated from fecal materials of cattle (390) and pigs (420) in Korea, respectively. One strain of O157:H7 isolated from cattle and 2 strains of O157:H7 isolated from pigs were identified as verotoxin-1 (VT-1) producing strains and 2 strains (O157:H7 and O157:H-) isolated from cattle were identified as verotoxin-2 (VT-2) producing strains by neutralization test on HeLa and Vero cells. Culture supernatants of the isolates were cytotoxic to HeLa and Vero cells. The levels of cytotoxin produced by isolates were  $10^2 \sim 10^4$  cytotoxic dose(CD<sub>50</sub>)/ml.

Also, VT-2-converting bacteriophage was isolated from KSC109 strain which had been isolated from cattle. Molecular weight of the phage DNA was determined as approximately 45 Kb in 0.8% agarose gel electrophoresis, and morphology of the phage stained with phosphotungstic acid was observed by transmissible electron microscopy.

**Key Words :** *E coli* O157, verotoxin, bacteriophage.

## 서 론

병원성 대장균은 O:H serogroup, 독소와 부착인자의 생산능력, enterocytes에 대한 작용 및 임상적 증상이나 증후등을 기초로 하여 enteropathogenic *E coli* (EPEC), enterotoxigenic *E coli* (ETEC), enteroinvasive *E coli* (EIEC) 및 enterohemorrhagic *E coli* (EHEC)의 4가지 주요군으로 분류한다<sup>1</sup>. 근년에 EHEC군에 속하는 Shiga-like toxin(SLT) 생산 대장균에 의한 환자가 속출하고, 이들 균의 항원성 및 생리화학적 성질등이 밝혀짐에 따라 많은 관심을 갖게 되었다.

Verotoxins(VTs) 생산 대장균은 사람 및 동물에서 hemolytic uremic syndrome, 출혈성 결장염, 수종성 질환 등을 유발한다<sup>2-4</sup>. 이들 독소의 종류는 항원으로 작용하는 특징에 따라 VT1, VT2 및 VTE등 3가지로 알려져 있으며<sup>3,5,6</sup>, 이중 VT1과 VT2의 생산은 파아지 DNA에 의하여 지배되며<sup>7-9</sup>, VTE의 생산은 chromosome에 의하여 지배된다<sup>10</sup>. VTs 각각은 생물학적 활성에서 다소의 차이를 나타내어 독소 구별의 중요한 지표로 이용된다. VT1과 VT2는 Vero cell과 HeLa cell에 높은 활성을 나타내며, Vero cell에 대한 활성에서 VT1은 VT2 보다 1,000배 더 높고 토끼에 대한 lethal dose(LD50)은 VT2가 VT1보다 100배 더 높은 것으로 밝혀져 있다. 생물학적 활성에서 이들 독소의 가장 중요한 차이점은 토끼에 접종하였을 때 VT2는 명백한 출혈성 결장염을 일으키는 반면 VT1은 가벼운 비출혈성 하리를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>11,12</sup>. 한편 VTE는 Vero cell과 Y-1 adrenal cell에는 활성을 나타내지만 HeLa cell에는 활성을 나타내지 못한다는 것이 밝혀져 VT1 및 VT2와 구별할 수 있게 되었다<sup>13,14</sup>.

현재까지 알려진 VT 생산 대장균의 혈청형은 43종으로 밝혀져 있으며 외국의 경우 VT로 인한 환자로부터 분리되는 균의 절반이상이 O157:H7인 것으로 알려져 있다<sup>2,15</sup>. 또한 *E coli* O157:H7에 의한 감염률은 *Campylobacter*와 *Salmonella* 보다 낮으며, *Shigella*에 의한 감염률보다는 높은 것으로 보고되어 있을 뿐만 아니라<sup>16</sup> 소의 분변재료, 원유, 돈육 및 계육에서 분리되고 있어, 공중보건학적인 측면에서도 중요하게 취급되고 있다<sup>17,18</sup>. 외국에서 verotoxin에 대한 연구는 VT 생산대장균의 분포조사, 분자생물학적인 연구, 면역화학적 진단법의 개발 등이 활발히 진행되고 있으나 국

내에서 이에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 verotoxin으로 인한 질병의 역학적 기초 자료로 활용코자 소와 돼지의 분변으로부터 VT 생산 대장균 중에서 중요하게 취급되고 있는 *E coli* O157의 분포를 조사하고 분리균의 생물학적 독성 및 독소생산을 지배하는 것으로 알려진 파아지를 분리하여 분자량을 검정하였다.

## 재료 및 방법

공시재료 : 소 390두 및 돼지 420두를 대상으로 하여 배변직후의 신선한 분변 또는 직장내용물을 멸균면봉으로 채취하여 무균생리식염수가 첨가된 수송용기(Culturette ; Becton Dickinson Co.)에 넣어 저온을 유지하면서 실험실로 운반하여 공시하였다.

*E coli* O157:H7의 분리 및 동정 : Farmer 등<sup>19</sup>의 방법에 따라 1% D-sorbitol을 첨가한 MacConkey agar base 평판배지에 직접도말하여 37℃에서 18~24시간동안 배양한 후 sorbitol을 분해하지 않는 집락을 선별하였다. 집락을 MacConkey agar plate에 도말하여 유당을 분해하는 집락을 *E coli* O157로 추정하고 이들 균주를 Edward와 Ewing<sup>20</sup>의 방법에 따라 생화학적 정상검사를 실시하였다. 혈청학적 동정은 *E coli* O157 항혈청(Difco)에 대하여 평판응집반응으로 응집유무를 확인하는 한편 Farmer 등<sup>19</sup>의 방법에 따라 *E coli* H7 항혈청으로 H항원의 혈청형을 동정하였다.

세포배양 및 세포독성 시험 : 세포독성 시험을 위한 세포주들은 국립보건원으로 부터 분양받은 Vero cell (African green monkey kidney cell) 및 HeLa cell을 사용하였고, 5% 우태아혈청과 100µg/ml의 gentamicin 및 100U/ml의 penicillin이 첨가된 minimal essential medium (MEM ;Sigma)에 계대배양하면서 공시하였다. *E coli* 분리주에 대한 세포독성시험은 Karmali 등<sup>21</sup>의 방법에 따라 분리균을 penassay broth (antibiotic medium no.3;Difco)에 접종한 후 37℃에서 18시간 배양하여, 배양상층액을 0.22µm membrane filter로 여과한 뒤, 배양여액을 2배 단계희석하여 96 well microplate에 단층 배양한 Vero cell과 HeLa cell에 각각 접종하였다.

접종한 plate는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 3일간 배양하면서 매일 cytopathic effects를 현미경으로 관찰하였으며, 배양 3일후 세포를 50% 사멸시키는 (CD<sub>50</sub>) 시료의 가장 높은 희석배수를 endpoint로 하여 VT2 활성의 정도를 결정하였다. CD50의 판정방법은 Mary 등<sup>22</sup>의 방법에 따라 배양한 plate를 조심스럽게 진탕하여 사멸한 세포와 배양액을 제거하고, 2% formalin이 첨가된 0.067M phosphate buffered saline (2% formalin-PBS, pH 7.2)으로 1분간 고정시킨 후, 0.13% crystal violet (5% ethanol-2% formalin- PBS)으로 20분간 염색하였다. 염색한 세포를 실온에서 건조시킨 후, 50% ethanol 200μl로 용출시키고 용출액 100μl를 0.9ml의 PBS에 희석하여 spectrophotometer 595nm에서 흡광도를 측정하였으며, 독소 비첨가 대조군의 흡광도와 대비하여 CD<sub>50</sub>을 정하였다.

파아지DNA의 분리 및 정제 : 분리균으로부터 bacteriophage의 분리는 O'Brien 등<sup>23</sup>의 방법에 따라 실시하였다. Donor 균주로서는 분리균중 VT2를 생산하는 *E coli* O157:H7 (KSC109)를 사용하였으며, recipient로서는 *E coli* C600을 사용하였다. Donor로서 *E coli* KSC109를 5ml의 LB broth(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.25% NaCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0.001% thiamine)에서 600nm의 파장으로 OD 0.5가 될 때까지 배양하여 원심시킨 후, 5ml의 10mM CaCl<sub>2</sub>로 현탁시켜 UV light 아래에서 1분간 조사함으로써 KSC109로부터 phage를 분리시켰다. 자외선에 조사된 cell을 37℃에서 5시간 배양한 후, 원심분리하여 상층액을 0.45μm membrane filter로 여과한 다음 4℃에 보관하면서 사용하였다. 100ml의 donor와 10mM CaCl<sub>2</sub>로 처리한 100μl의 recipient *E coli* C600을 혼합하여 37℃에서 20분간 배양하였으며, 3ml의 soft agar에 혼합하고 LB agar plate에 도말한 후 37℃에서 18시간 배양하여 플라크를 형성시켰다. 플라크는 SM 완충액 [NaCl 5.8g, MgSO<sub>4</sub> 2g, 1M Tris(pH 7.5) 50ml, 2% gelatin per liter]으로 현탁시켜 4℃에서 보존하였다.

Phage의 정제는 Yamamoto등<sup>24</sup>의 방법에 준하여 cesium chloride density gradients로써 정제하였다.

Phage 용액에 DNase와 RNase를 첨가하고 최종농도 1

M이 되도록 NaCl을 첨가하여 원심분리시켜 상층액을 취하였다. 상층액에 최종농도 10%가 되도록 PEG 6000을 첨가한 다음 원심분리하여 phage 입자를 침전시키고, 이 침전물을 SM 완충액으로 현탁한 후 동량의 phenol/chloroform을 가하여 원심분리하고 phage가 포함된 상층액을 회수한 후 최종농도가 50% 되도록 cesium chloride를 첨가하였다. 미리 형성된 cesium chloride step gradients에 50% cesium chloride가 함유되어있는 phage 용액을 첨가하여 22,000rpm으로 4℃에서 2시간동안 원심분리시켜 ρ1.45와 ρ1.50 사이의 bacteriophage를 21 gauge needle로 수집하였다. 이 phage 입자에 충분한 cesium chloride (1.5 g/ml)를 첨가하여 4℃에서 35,000rpm으로 24시간동안 원심분리시켜 상기와 동일한 방법으로 phage를 수집하였다. 1,000배 volume의 투석용액 [10mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM MgCl<sub>2</sub>]으로 실온에서 1시간 투석하여 정제된 phage 용액으로부터 cesium chloride를 제거한 후 최종농도가 2mM 되도록 EDTA를 첨가하였다. Pronase와 SDS를 최종농도 0.5mg/ml과 0.5% 되도록 각각 첨가하여 37℃에서 1시간 배양하였으며, 동량의 phenol을 첨가한 후 원심분리시켜 상층액을 취하고 동량의 phenol/chloroform 용액으로 처리하였다. 추출한 DNA 용액을 1,000배 volume의 투석용액 [10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA]으로 4℃에서 연속적으로 3번 투석한 후 ethanol로 침전시켜 phage DNA를 준비하였고 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 phage DNA의 분자량을 검정하였다.

파아지의 형태관찰 : 분리한 파아지에 동량의 phosphotungstic acid를 혼합하고 400 mesh collidon coated electron microscope에 부착시켜 건조시킨 다음 TEM에서 X68,000로 관찰하였다.

## 결 과

동물 분변재료에서 *E coli* O157의 분리 : 소 390두와 돼지 420두의 분변재료로부터 분리한 *E coli*에 대하여 *E coli* O157의 항혈청으로 평판 응집반응을 실시한 결과, Table 1에서와 같이 소에서 3주 및 돼지에서 2주가 분리되었다. H7 항혈청형에 대한 immobilization test 결과 소에서 분리한 3주중 2주와 돼지에서 분리한 2주는 H7으로

**Table 1.** Isolation rate of *E coli* serotype O157 from animal feces

Source	No. of sample tested	No. of O157 serotype (%)		Total (%)
		O157:H7	O157:H-	
Cattle	390	2(0.51)	1(0.27)	3(0.78)
pig	420	2(0.48)	-	2(0.48)

동정되었으며, 소에서 분리한 3주중 1주는 H-로 분류되었다.

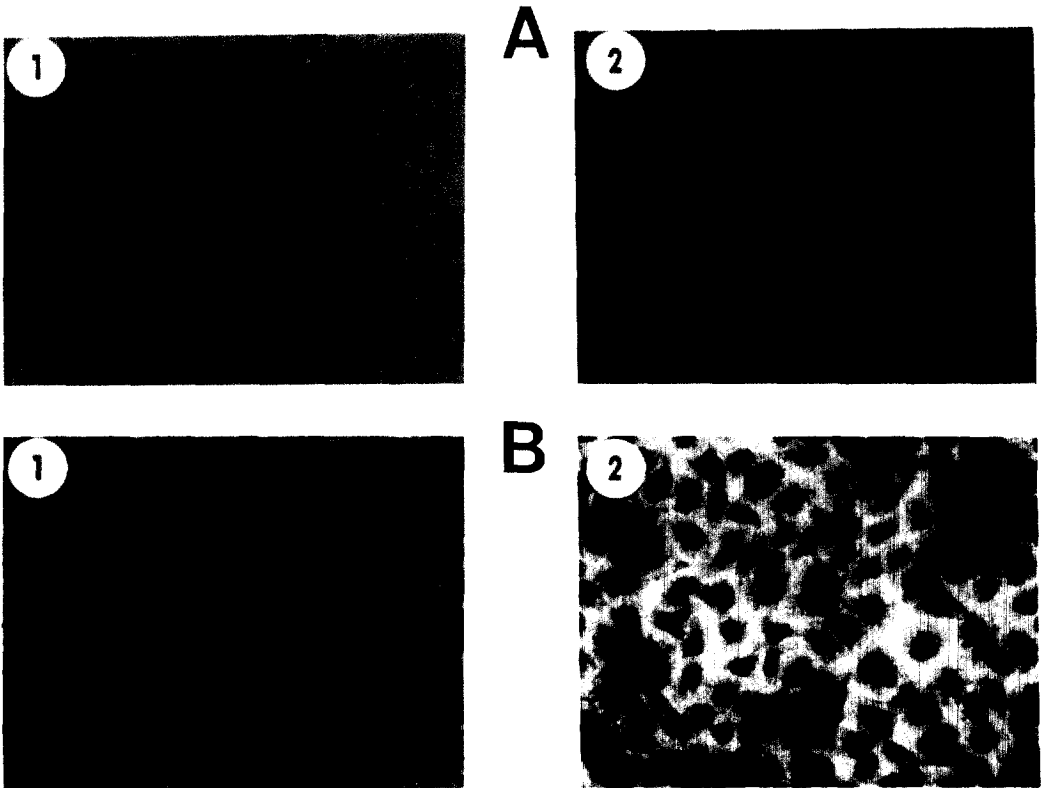
분리균의 세포독성 역가 : 소와 돼지의 분변재료에서 분리한 배양여액을 HeLa cell과 Vero cell에 대하여 세포독성을 조사하고 중화법으로 분리균이 생산하는 독소형을 확인한 결과는 Table 2 및 Fig 1과 같다. 분리균 모두 HeLa cell과 Vero cell에 대하여  $10^2 \sim 10^4$ 까지의  $CD_{50}$ 을 나타내었으며, 소에서 분리한 3주중 2주가 VT2를, 나머지 1주와 돼지에서 분리한 2주는 VT1을 생산하는 것으로 확인되었다. 분리균중 소에서 분리한 KSC

**Table 2.** Cytotoxicity titers of the culture filtrates of the strains isolated from animal feces

Source	Strains	Type of toxin produced	Serotypes	Cytotoxicity titers( $CD_{50}/ml$ )	
				HeLa	Vero
				Cattle	KSC47
	KSC109	II	0157:H7	$10^3$	$10^3$
	KSC370	II	0157:H-	$10^3$	$10^3$
Pig	KSP214	I	0157:H7	$10^3$	$10^3$
	KSP325	I	0157:H7	$10^3$	$10^3$

109를 bacteriophage 분리를 위한 donor 균주로 선택하였다.

Bacteriophage의 분리 및 전자현미경적 관찰 : 분리균 KSC109를 UV light 아래서 1분간 조사하여 bacteriophage를 분리한 후, lawn cell인 *E coli* C600과 동량으로 혼합하고 배양액 100 $\mu$ l를 0.5% soft agar 3ml에 혼합하여 LB agar plate에 분주한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 15~18시간 배양한 결과 Fig. 2와 같이 많은 플라크를 형성하였다. 이 플라크를



**Fig 1.** Micrographs of CPE in the Vero(A) and HeLa cells(B) exposed to a cultured filtrates of KSC109. A-1 and B-1 were normal cells, A-2 and B-2 were cells exposed to cultured filtrates of KSC109 strain for 36hrs.

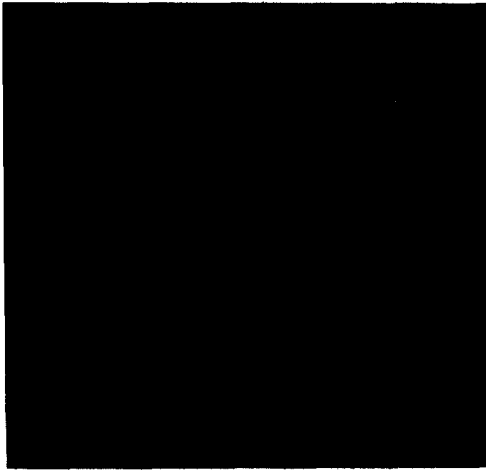


Fig 2. Phage plaques isolated from KSC109 strain on LB agar plate.

정제하고 phospho-tungstic acid로 염색하여 전자현미경 하에서 68,000배로 관찰한 결과 bacteriophage 특유의 머리와 꼬리 형태가 관찰되었다(Fig 3).

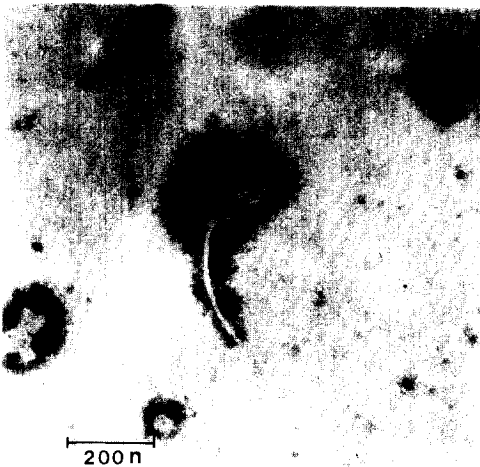


Fig 3. Electron micrograph of purified phage stained with phosphotungstic acid (X 68,000).

Phage DNA의 분리 : Cesium chloride density gradient로써 phage를 정제하고 phage DNA를 추출하여 0.8% agarose gel에서 전기영동한 결과는 Fig. 4와 같이, 분자량 약 45 kb 정도의 단일 DNA band가 확인되었다.

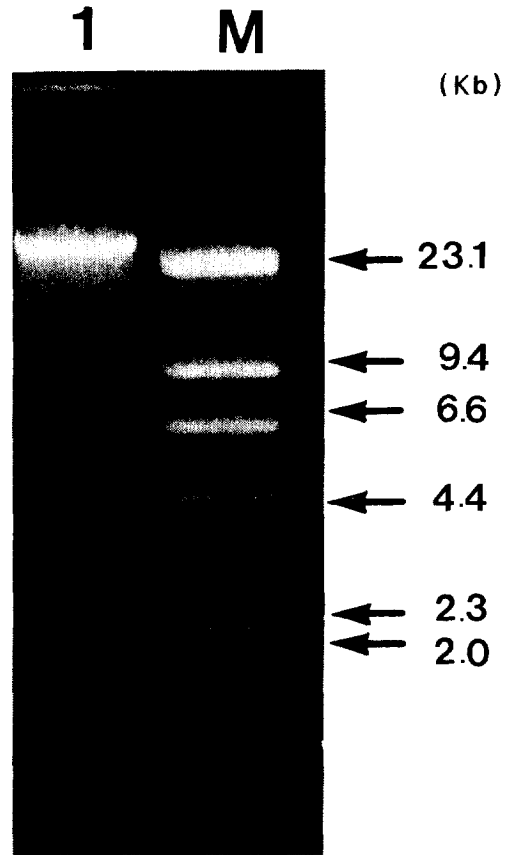


Fig 4. Agarose gel (0.8%) electrophoresis and EtBr staining of DNA from plaque-purified, CsCl gradient isolated phage. The size of the phage DNA was determined by their relative electrophoretic mobilities compared to *Hind*III digested fragments of  $\lambda$  DNA. (lane 1; phage DNA, M: marker)

## 고 찰

현재 verotoxin 생산 대장균은 43종의 혈청형이 밝혀져 있고<sup>1</sup>, 이들중 혈청형 O157은 verotoxin에 노출된 환자수의 절반이상에서 분리되며<sup>2,15</sup> 이는 유통되고 있는 여러종류의 식육재료에서도 분리된다. 외국의 경우 verotoxin 생산 대장균은 소의 분변재료에서 11~84%, 원유에서 10%, 돈육에서 1.5~3.8% 그리고 계육에서 0~1.5%가 분리 보고된 바 있어 이들 식육을 재료로한 식품으로의 오염가능성 때문에 공중보건상 매우 중요시 되고 있다<sup>17,18</sup>. 그러나 국내에서는 verotoxin 생산 대장균에 대한 분리보고가 전혀 이루어져 있지 않아 기

초자료수집이 시급한 실정이다.

본 연구에서는 이러한 목적으로 소와 돼지의 분변으로부터 verotoxin을 생산하는 *E coli*중 중요하게 취급되고 있는 혈청형 O157을 분리 조사한 결과, 소 390두의 분변재료에서 3주, 돼지 420두의 분변재료에서 2주를 분리하였다. 소에서 유래한 3주중 2주와 돼지에서 유래한 2주를 H 혈청형으로 형별한 결과 H7이었고, 소에서 유래한 1주는 H-였다. 또한 분리균들의 배양상층액에 대하여 HeLa cell과 Vero cell에 대한 세포독성 시험을 실시한 결과 분리균 모두 verotoxin 생산 대장균으로 확인되었으며, Bartlett 등<sup>25</sup>과 Prado 등<sup>26</sup>의 방법에 따른 중화법으로 독소형을 결정할 수 있었다.

본 시험에서 가축으로부터 분리한 *E coli* O157:H7의 분리율은 Montenegro등<sup>27</sup>이 259두의 건강우중 2두로부터 분리보고한 분리빈도와 유사한 결과를 나타내었다. Montenegro등<sup>27</sup>은 O157:H7 혈청형외의 verotoxin 생산 대장균의 분리율은 10.8%이었고 분류된 혈청형은 사람에게도 병원성이 강한 O22, O39, O82, O91, O113, O116, O126 및 O136등이었다는 점을 미루어 볼때 본 실험에 공시된 가검물에서도 다양한 혈청형의 verotoxin 생산 대장균이 분류될 것으로 생각된다.

소의 분변재료로부터 분리된 VT2 생산 KSC109 균주로부터 VT2-converting bacteriophage를 분리하고 cesium chloride density gradient로 정제하여 전자현미경으로 관찰한 결과 O'Brien 등<sup>23</sup>의 성적과 일치하는 전형적인 bacteriophage의 형태를 나타내었다. O'Brien 등<sup>23</sup>은 bacteriophage 분리를 위하여 lawn cell로 *E coli* K12를 사용하였으나 본 연구에서는 *E. coli* C600을 이용하여 phage를 분리하였고, phage DNA를 추출 정제하였다. 1984년 O'Brien 등<sup>23</sup>은 VT2 생산 대장균인 *E coli* 933W로부터 phage DNA를 추출한 결과 47 kb라고 보고하였으나 본 연구에서의 분리균 KSC 109로부터 분리한 phage DNA는 45 kb로 확인되어 다소의 차이를 나타내었다.

Verotoxin 생산 대장균중 VT1과 VT2를 생산하는 균주는 phage DNA에 의하여 독소생산이 조절되며<sup>7-9</sup>, 이 유전자는 *Shigella dysenteriae* 및 *Shigella flexinari*의 DNA와 동질성이 있는 것으로 알려져 있다. 많은 연구자들이 VT1과 VT2의 유전자를 클로닝하여 염기서열을 결정한 바 있다<sup>7-9,23</sup>. 본 연구에서 분리된 국내 분리주인 *E coli* O157:H7(KSC109)의 phage DNA에 대해

여도 염기배열을 결정하여 외국 분리주와의 동질성을 확인하고 역학적으로 규명이 되어야 할 것으로 사료된다.

특히 1994년 감염병 발생정보지<sup>28</sup>에 의하면 국내에서 최초로 식중독 환자로부터 *E coli* O157:H7이 분리된 바 있어 이들 균에 대한 국내의 분포조사가 시급한 것으로 사료되며, verotoxin의 높은 독성과 병원성에 관심을 갖고 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

1. 소 390두와 돼지 420두의 분변재료로부터 각각 3주와 2주의 *E coli* O157을 분리하였다.

2. 소에서 분리한 O157:H7 1주와 돼지에서 분리한 O157:H7 2주는 VT-1 생산 균주로 그리고 소 유래 O157:H7 및 O157:H- 균주는 VT-2 생산 균주로 동정되었다.

3. 이들 분리균의 배양여액은 모두 HeLa cell과 Vero cell에 대하여  $10^2 \sim 10^4$  CD50/ml의 독성을 나타내었다.

4. VT-2 생산 대장균인 KSC109 균주로부터 *E coli* C600을 lawn cell로 하여 bacteriophage를 분리할 수 있었고 전자현미경으로 관찰한 결과 파아지 특유의 head & tail의 형태가 관찰되었다.

5. 파아지로부터 DNA를 추출하여 0.8% agarose gel 로 전기영동한 결과 분자량은 약 45 Kb 이었다.

## 참 고 문 헌

1. Albert B, William JHJr, Henry DI, et al. MJ. *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. 367~370, 1991.
2. Karmali MA. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 151 : 775~782, 1985.
3. Konowalchuk J, Speirs JI and Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 18 : 775~779, 1977.
4. Pai CH, Ahmed N, Lior H, et al. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* : a two year prospective study. *J Infect Dis*, 157 : 1054~1057, 1988.
5. Konowalchuk J, Dickie N, Stavric S, et al. Com-

- parative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 22 : 644~648, 1978.
6. Konowalchuk J, Dickie N, Stavric S and Speirs JL. Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. *Infect Immun*, 20 : 575~577, 1978.
  7. Jacson MP, Neill RJ, O'Brien AD, et al. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol Letters*, 44 : 109~114, 1987.
  8. Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, et al. Verotoxin-production in strains of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet* ii, 216, 1983.
  9. Strockbine NA, Marques LRM, Newland JW, et al. Two toxin converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infect Immun*, 53 : 135~140, 1986.
  10. Yee AJ, DeGrandis S, Gyles CL. Mitomycin-induced synthesis of a shiga-like toxin from enteropathogenic *Escherichia coli* H.I.8. *Infect Immun*, 61 : 4510~4513, 1993.
  11. Head SC, Karmali MA and Lingwood CA. Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits. *J Biol Chem*, 266 : 3617~3621, 1991.
  12. Head SC, Richardson SE, Petric M, et al. Purification and biological properties of verocytotoxin 2. Abs B-61. Presented at The 88th Annual Meeting of The American Society of Microbiology Miami Beach. 8~13 May 1988.
  13. Blanco J, Gonzalez EA, Bernardez I, et al. Differentiated biological activity of vero cytotoxins(VT) released by human and porcine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Letts*, 20 : 167~170, 1983.
  14. Marques LRM, Peiris JSM, Cryz SJ, et al. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol Lettes*, 44 : 33~38, 1987.
  15. Hockin JC, Lior H. Hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome caused by to *Escherichia coli* O157:H7 in Canada. *Can Dis Wkly Rep*, 13 : 203~204, 1987.
  16. MacDonald KL, O'Leary MJO, Cohen ML, et al. *Escherichia coli* O157:H7, an emerging gastrointestinal pathogen. *JAMA*, 259 : 3567~3570, 1988.
  17. Read SC, Gyles CL, Clarke RC, et al. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork and chicken in Southwestern Ontario. *Epidemiol Infect*, 105 : 11~20, 1990.
  18. Suthienkul O, Brown JE, Seriwatana J. Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retailmeats and cattle in Thailand. *Appl Environ Microbiol*, 56 : 1135~1139, 1990.
  19. Farmer JJ, Davis BR. H7 antiserum-sorbitol fermentation medium : a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 as associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol*, 22 : 620~625, 1985.
  20. Edwards PR, Ewing WH. *Identification of enterobacteriaceae*. 4th ed. Elsevier Science publishing Co., New York, 93~136, 1986.
  21. Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 2 : 15~38, 1989.
  22. Mary GK, Joel MD. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. *J Clin Microbiol*, 12 : 361~366, 1980.
  23. O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, et al. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*, 226 : 694~696, 1984.
  24. Yamamoto KR, Alberts BM, Benzinger R, et al. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*, 40 : 734, 1970.
  25. Bartlett III AV, Prado D, Cleary TG, et al. Production of Shiga toxin and other cytotoxins by serogroups of *Shigella*. *J Infect Dis*, 154 : 996~1002,

- 1986.
26. Prado D, Cleary TG, Pickering LK, et al. The relation between production of cytotoxin and clinical features of shigellosis. *J Infect Dis*, 154 : 149~155, 1986.
27. Montenegro MA, Bulte M, Trumpf T, et al. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J Clin Microbiol*, 28 : 1417~1421, 1990.
28. 국립보건원. 감염병발생정보. 5 : 133, 1994.
-